

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 522号	学位授与年月日	平成21年 3月10日
氏 名	高 橋 太 郎		
論文題目	Intracranial self-stimulation enhances neurogenesis in hippocampus of adult mice and rats (脳内自己刺激は成体ネズミの海馬における神経新生を促進する)		

博士(医学) 高 橋 太 郎

Intracranial self-stimulation enhances neurogenesis in hippocampus of adult mice and rats

(脳内自己刺激は成体ネズミの海馬における神経新生を促進する)

論文内容の要旨

[はじめに]

海馬の歯状回顆粒細胞層では大人になっても新しいニューロンが誕生する。細胞新生は、薬物やストレスなど様々な因子によって、正と負の両方向性の調節を受ける。そのうち、齧歯類では回転籠におけるランニングが最も強力な正の調節因子の一つとして働くことが知られている。しかしながら、ランニングがどのようなメカニズムで海馬の神経新生を増強するかについてはよく分かっていない。ランニングは運動であるが同時に報酬にもなるので、両要因がともにニューロン新生促進効果に関与する可能性がある。そこで、本研究では、免疫組織化学法を用いて、脳刺激による報酬が成体ネズミにおける海馬の神経新生にどのような効果をもたらすかについて調べた。

[材料及び方法]

CBA 系雄性マウス 44 匹と SD 系雄性ラット 61 匹を用いた。新生細胞の特徴を調べる実験ではマウスとラットを用いた。マウスは何の処置も行わない正常対照群(n=15)、電極埋め込み手術を行うが刺激は与えない偽手術群(n=15)及び手術により埋め込んだ電極から刺激を与える自己刺激群(n=14)の 3 群に分けた。ラットは偽手術群(n=17)と自己刺激群(n=19)の 2 群に分けた。また、自己刺激用の電極は内側前脳束に埋め込んだ。術後 1 週間以上の回復期間を置き、内側前脳束の刺激を報酬とする自己刺激訓練を 3 日間(1 時間/日)にわたって行った。そして、最終日の訓練終了直後に細胞新生マーカーである 5-bromodeoxyuridine (BrdU)を腹腔内(マウス: 50 mg/kg; ラット: 150 mg/kg)に投与し、1 日後、1 週間後及び 4 週間後に灌流固定して脳を取り出した。その後、凍結した脳から連続切片を作成し、免疫染色を施し、歯状回顆粒細胞層の BrdU 陽性細胞の発現量を調べた。他の 2 群についても同様の手続きを用いて BrdU 陽性細胞数を計測した。さらに、成熟した 4 週間後の BrdU 陽性細胞が神経細胞とグリア細胞のどちらであるかを調べるために、それぞれのマーカーである Neuronal nuclei (NeuN)と Glial fibrillary acidic protein (GFAP)を用いて、蛍光二重染色を施した。一方、成熟した神経細胞が機能を示すか否かを調べる実験ではラットのみを用いた。3 日間の自己刺激訓練後に BrdU を腹腔内投与したラット 25 匹を以下の 4 群に分けた。すなわち、何の行動負荷も与えない正常対照群(n=7)、6 週間後に 1 日 6 試行(1 分間/試行)の水迷路訓練を 3 日間行わせる実験群(n=8)、同様の訓練手続きでプールを泳がせるだけのヨークト対照群 (n=7)、及び Pentylene tetrazol (PTZ)を投与する PTZ 群 (n=3)である。実験群のラットについては、最終日の訓練終了 2 時間後に灌流固定を行い、取り出した脳を凍結後、連続切片を作成して、BrdU と活性化されたニューロンマーカーである Fos タンパクとの二重染色を施し、その発現量を調べた。他の群についても同様の手続きで二重染色細胞数を計測した。なお、PTZ 群ラットは Fos タンパク発現の陽性対照として用いた。

[結果]

マウス海馬歯状回顆粒細胞層における BrdU 陽性細胞の発現量を比較したところ、いずれの群においても、1 日後と 4 週間後に比べ、1 週間後が最も高かった(p<0.05)。また、3 群の中では、自己刺激群の BrdU 発現細胞数が、いずれの場合においても、最も多かった(p<0.001)。さらに、自己刺激群の BrdU 陽

性細胞数は、非刺激側に比べ、刺激側で有意に多かった($p<0.001$)。なお、正常対照群と偽手術群の BrdU 陽性細胞数には有意差は認められなかった。

ラットの BrdU 陽性細胞の発現量についてもほぼ同じ結果が得られた。加えて、自己刺激群ラットにおける 4 週間後の BrdU 発現細胞は、約 82% が NeuN 陽性、一方約 16% が GFAP 陽性を示した。

ラット歯状回顆粒細胞層において、ニューロン活動の指標となる Fos タンパク陽性細胞の発現量を比較したところ、PTZ 群を除く 3 群の中では、水迷路学習を課した実験群が最も高かった($p<0.001$)。また、BrdU 陽性細胞数に占める Fos 陽性細胞数の割合についても、他の 2 群と比べ、実験群が最も高かった($p<0.001$)。

[考察]

自己刺激により、マウスとラットのいずれの海馬歯状回顆粒細胞層においても BrdU 陽性細胞が刺激側有意に発現したことから、脳刺激による報酬は、ネズミの海馬における細胞新生を促進することが示唆された。また、脳刺激報酬により新生した細胞の 8 割が、4 週後にニューロンマーカーである NeuN で染まることから、新生細胞の多くがニューロンに成熟することが示唆された。さらに、成熟した新生細胞は、水迷路学習を遂行後に活性化されたニューロンマーカーである Fos タンパクを共発現したことから、海馬依存性学習機能を有するニューロンになりうることを示唆された。

[結論]

脳内刺激による報酬は、海馬において、成熟して機能的ニューロンとなる新生細胞を増加させることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

海馬の歯状回顆粒細胞新生は、薬物やストレスなど様々な因子によって調節を受ける。そのうち、齧歯類ではランニングが最も強力な正の調節因子の一つとして働くことが知られている。しかしながら、ランニングがどのようなメカニズムで海馬の神経新生を増強するかについてはよく分かっていない。ランニングは運動であるが同時に報酬にもなるので、両要因がともにニューロン新生促進効果に関与する可能性がある。そこで、申請者は、脳刺激による報酬が成体ネズミにおける海馬の神経新生にどのような効果をもたらすかについて調べた。

CBA 系雄性マウス 44 匹と SD 系雄性ラット 61 匹を用いた。マウスは正常対照群($n=15$)、偽手術群($n=15$)及び自己刺激群($n=14$)の 3 群に分けた。ラットは偽手術群($n=17$)と自己刺激群($n=19$)の 2 群に分けた。また、自己刺激用の電極は内側前脳束に埋め込んだ。術後 1 週間以上の回復期間を置き、内側前脳束の刺激を報酬とする自己刺激訓練を 3 日間(1 時間/日)にわたって行った。そして、最終日の訓練終了直後に細胞新生マーカーである 5-bromodeoxyuridine (BrdU)を腹腔内(マウス: 50 mg/kg; ラット: 150 mg/kg)に投与し、1 日後、1 週間後及び 4 週間後に灌流固定して脳を取り出した。その後、凍結した脳から連続切片を作成し、免疫染色を施し、歯状回顆粒細胞層の BrdU 陽性細胞の発現量を調べた。他の 2 群についても同様の手続きを用いて BrdU 陽性細胞数を計測した。さらに、成熟した 4 週間後の BrdU 陽性細胞が神経細胞とグリア細胞のどちらであるかを調べるために、それぞれのマーカーである Neuronal nuclei (NeuN)と Glial fibrillary acidic protein (GFAP)を用いて、蛍光二重染色を施した。一方、成熟した神経細胞が機能を示すか否かを調べる実験では、3 日間の自己刺激訓練後に BrdU を腹腔内

投与したラット 25 匹を以下の 4 群に分けた。すなわち、正常対照群(n=7)、6 週間後に 1 日 6 試行(1 分間/試行)の水迷路訓練を 3 日間行わせる実験群(n=8)、同様の訓練手続きでプールを泳がせるだけのヨークト対照群(n=7)、及び Pentylene tetrazol (PTZ)を投与する PTZ 群(n=3)である。実験群のラットについては、最終日の訓練終了 2 時間後に灌流固定を行い、取り出した脳を凍結後、連続切片を作成して、BrdU と活性化されたニューロンマーカーである Fos タンパクとの二重染色を施し、その発現量を調べた。他の群についても同様の手続きで二重染色細胞数を計測した。なお、PTZ 群ラットは Fos タンパク発現の陽性対照として用いた。

マウス海馬歯状回顆粒細胞層における BrdU 陽性細胞の発現量を比較したところ、いずれの群においても、1 日後と 4 週間後に比べ、1 週間後が最も高かった($p<0.05$)。また、3 群の中では、自己刺激群の BrdU 発現細胞数が、いずれの場合においても、最も多かった($p<0.001$)。さらに、自己刺激群の BrdU 陽性細胞数は、非刺激側に比べ、刺激側で有意に多かった($p<0.001$)。なお、正常対照群と偽手術群の BrdU 陽性細胞数には有意差は認められなかった。

ラットの BrdU 陽性細胞の発現量についてもほぼ同じ結果が得られた。加えて、自己刺激群ラットにおける 4 週間後の BrdU 発現細胞は、約 82%が NeuN 陽性、一方約 16%が GFAP 陽性を示した。ラット歯状回顆粒細胞層において、ニューロン活動の指標となる Fos タンパク陽性細胞の発現量を比較したところ、PTZ 群を除く 3 群の中では、水迷路学習を課した実験群が最も高かった($p<0.001$)。また、BrdU 陽性細胞数に占める Fos 陽性細胞数の割合についても、他の 2 群と比べ、実験群が最も高かった($p<0.001$)。

自己刺激により、マウスとラットのいずれの海馬歯状回顆粒細胞層においても BrdU 陽性細胞が刺激側有意に発現したことから、脳刺激による報酬は、ネズミの海馬における細胞新生を促進することが示唆された。また、脳刺激報酬により新生した細胞の 8 割が、4 週後にニューロンマーカーである NeuN で染まることから、新生細胞の多くがニューロンに成熟することが示唆された。さらに、成熟した新生細胞は、水迷路学習を遂行後に活性化されたニューロンマーカーである Fos タンパクを共発現したことから、海馬依存性学習機能を有するニューロンになりうることを示唆された。審査委員会では、脳刺激による報酬が成体ネズミにおける海馬の神経新生にどのような効果を及ぼすかを世界で初めて解析した点を高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) BrdU で細胞新生が分かるのはなぜか
- 2) ヒトでの神経幹細胞について
- 3) レバー押し学習について
- 4) 脳内報酬系について
- 5) 脳内自己刺激について
- 6) 電気刺激と Fos の関係について
- 7) 電極埋め込み手術について
- 8) 電気刺激の条件について
- 9) ヨークト対照について
- 10) 報酬系と海馬について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文

にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者

主査 佐藤 康二

副査 難波 宏樹

小杉 伊三夫